

## *Xanthomonas* sp. EPS-1이 생산하는 다당류의 리올로지 특성

손봉수\* · 박석규<sup>1</sup> · 강신권 · 이상원 · 성낙계  
경상대학교 식품공학과, <sup>1</sup>순천대학교 식품영양학과

### Rheological Properties of Exopolysaccharide Produced by *Xanthomonas* sp. EPS-1

Bong-Soo Son\*, Seok-Kyu Park<sup>1</sup>, Shin-Kwon Kang,  
Sang-Won Lee and Nack-Kie Sung

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea  
<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

**Abstract** — For the screening of a new functional exopolysaccharide, sugar composition and rheological properties of exopolysaccharide produced from *Xanthomonas* sp. EPS-1 were investigated. The average molecular weight of exopolysaccharide was determined to be approximately  $2.1 \times 10^6$  dalton. The new exopolysaccharide EPS-1 was composed of mannose, glucose, galactose and glucosamine. IR analysis showed that the exopolysaccharide EPS-1 was assumed to be polymer with carbohydrates. NMR analysis showed that exopolysaccharide EPS-1 was presumed to be 4 units of sugar and trace of  $\text{CH}_3$  group. Exopolysaccharide EPS-1 solution showed a characteristic of non-Newtonian fluid properties. At the concentration of 1.0%, the consistency index and the flow behavior index were shown at 10.8352 poise·sec<sup>-n</sup> and 0.4419, respectively. All dispersions were pseudoplastic fluids described accurately by Power-law model. Exopolysaccharide EPS-1 was highly viscous at low concentration, with good stability over a wide range of pH 5 to 13. The excellent compatibility of exopolysaccharide EPS-1 was represented with salts such as sodium chloride.

일반적으로 다당류는 hydrophillic colloid(1)로서 shear thinning property, 화학적 안정성, 가공 효율성 등이 양호하며(2), 주로 식물체나 해조류 등으로부터 생산된다(3). 이들은 한정된 물량과 불균일한 품질 등이 문제점으로 지적되어 이러한 단점을 해결하고자 미생물성 다당류를 탐색하기 시작하였고 현재 미생물성 다당류들은 각종 산업의 보조제로서 광범위하게 이용되고 있다(4). 특히 미생물성 다당류는 그들의 구조와 레올로지 성질(1, 3)이 특이하여 이용이 점점 확대될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 전보에서 보고(5)된 분리균 *Xanthomonas* sp. EPS-1이 생산하는 다당류의 구성성분과 기본적인 레올로지 성질을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주배양 및 다당류 EPS-1의 분리

Key words: Exopolysaccharide, *Xanthomonas* sp., rheological properties

\*Corresponding author

자연계로부터의 분리균인 *Xanthomonas* sp. EPS-1을 sucrose 50 g, peptone 1.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 g, NaCl 3 g,  $\text{CaCO}_3$  0.05 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.07 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g, 증류수 1l의 배지(5)로 jar fermentor에서 통기량 3 vvm, 300 rpm, 30°C 조건으로 72시간 배양하여 isopropanol과 cetylpyridium 침전법으로 다당류(이하 다당류 EPS-1으로 표기)를 분리·정제하였다(6).

##### 다당류의 분자량 측정

분자량 측정을 위하여 증류수로 충분히 용출시킨 Sepharose 4B(Sigma)칼럼(4.5×90 cm)을 이용하여 gel permeation chromatography(GPC)를 행하였다. 표준물질로서는 분자량 200만, 50만, 7만, 4만 dalton인 dextran(Sigma)을 각각 0.3% 용액 5 ml를 loading 한 후 시간당 20 ml의 유속으로 tube 당 5 ml 씩 분취하였으며 총 탄수화물의 양은 케놀황산법으로 측정하였다. 이때 흡재 부피( $V_0$ )는 blue dextran( $M_w$ ,  $2 \times 10^6$  dalton)을 이용하여 결정하였으며 *Xanthomonas* sp. EPS-1이 생산하는 다당류의 분자량은  $V_0$ 에

대한 표준물질의 용기부피( $V_e$ )의 비율( $V_e/V_0$ )과 log scale의 분자량과의 관계를 표준곡선으로 나타내어 분자량을 결정하였다(7, 8).

### 다당류의 성분분석

정제된 다당류 EPS-1의 당조성은 10 mg의 다당류 EPS-1을 2 N- $H_2SO_4$  2 ml에 녹여 100°C에서 2시간 동안 가열처리하고  $Ba(OH)_2$ 로 중화시킨 후 원심분리하여 침전물을 제거한 뒤 0.25  $\mu m$  membrane filter로 여과하고 감압농축하여 HPLC(Waters)를 이용하여 분석하였으며, 이 때 칼럼은 carbohydrate column(7.5 mm  $\times$  30 cm)을 사용하여 78% acetonitril을 용매로 분당 1.6 ml 씩 용출시켜 표준당과 비교하여 다당류 EPS-1이 함유하는 단당류를 분리·확인하였다. 크로마토그래피법에 의하여 분리된 다당류 EPS-1의 적외선 스펙트럼은 IR-spectrophotometer(FTIR, FTS-20/80, Biorad, Digilab. Division, U.S.A)를 사용하여 KBr pellet 법으로 측정하였으며 핵자기 공명 스펙트럼( $^1H$ ,  $^{13}C$ )은 FT 500 MHz NMR(Bruker, AMX, Germany)을 이용하여  $D_2O$  용매에서 측정하였다.

### 점도측정

생산된 다당류 점도측정은 Brookfield-synchloetic viscometer(LVT, U.S.A)를 사용하였으며 필요에 따라 UL-adapter를 부착하여 사용하였다.

### 리올로지 특성의 해석

Rheological properties는 Power-law equation(식 1)과 Herschel-Bulkley 상태방정식(식 2)을 이용하여 해석하였다(9-12).

$$\text{즉, } \tau = K \cdot \gamma^n \quad (1)$$

$$\tau = \tau_y + K \cdot \gamma^n \quad (2)$$

그리고 항복응력( $\tau_y$ )은 다음 Casson equation을 이용하여 구하였다(12-14).

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + K\sqrt{\gamma} \quad (3)$$

한편 다당류 수용액의 흐름거동(flow behavior)에 대한 온도의 영향은 Arrhenius 관계에 의하여 해석하였다(13-15).

$$\text{즉, } \eta_a = A \cdot \exp(E_a/RT) \quad (4)$$

## 결과 및 고찰

### 분자량

0.3% 다당류 EPS-1 용액 5 ml를 Sepharose 4B 칼럼에 loading 한 후 GPC 하여 얻은 peak 부분(data 생략)인 fraction 13번에서 27번까지의 분획을 모아 동결 건조한 시료와 표준 탄수화물을 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 따라서 *Xanthomonas* sp. EPS-1이 생산하는 다당류의 분자량을 외삽법으로 추정된 결과는  $2.1 \times 10^6$  dalton으로 나타났다.

### 다당류 EPS-1의 구성성분

HPLC 다당류 EPS-1의 산가수 분해물을 HPLC 법으로 RI detector를 이용하여 표준시료와의 용출 시간을 비교분석한 결과(Fig. 2), 주성분은 glucose와 glucosamine 인 것으로 판단되며, 미량의 mannose와 galactose가 검출되었다. 따라서 다당류 EPS-1은 mannose, glucose, galactose 및 glucosamine으로 구성되었다는 것을 확인할 수 있었다.

IR spectroscopy KBr pellet 법을 이용하여 정제 다당류 EPS-1의 적외선 흡수스펙트럼을 조사한 결과(Fig. 3), 다당류 EPS-1은 9개의 흡수 띠를 보여 주었는데 그 중  $3453.88 \text{ cm}^{-1}$ 에서 수소결합에 의한 것으로 판단되는 강하고 넓은 흡수띠인 O-H 신축 진동 흡수띠가 확인되었으며,  $2910.06 \text{ cm}^{-1}$ 에서 C-H 신축 진동 흡수띠,  $1731.76 \text{ cm}^{-1}$ 에서 C=O 신축 진동 흡수띠를 보이는 것으로 보아 carboxyl 기가 존재하며  $1409.71 \text{ cm}^{-1}$ 에서  $CH_2$  bending이 관찰되어 탄수화물에서 찾아 볼 수 있는 peak 들이 관찰되었다.

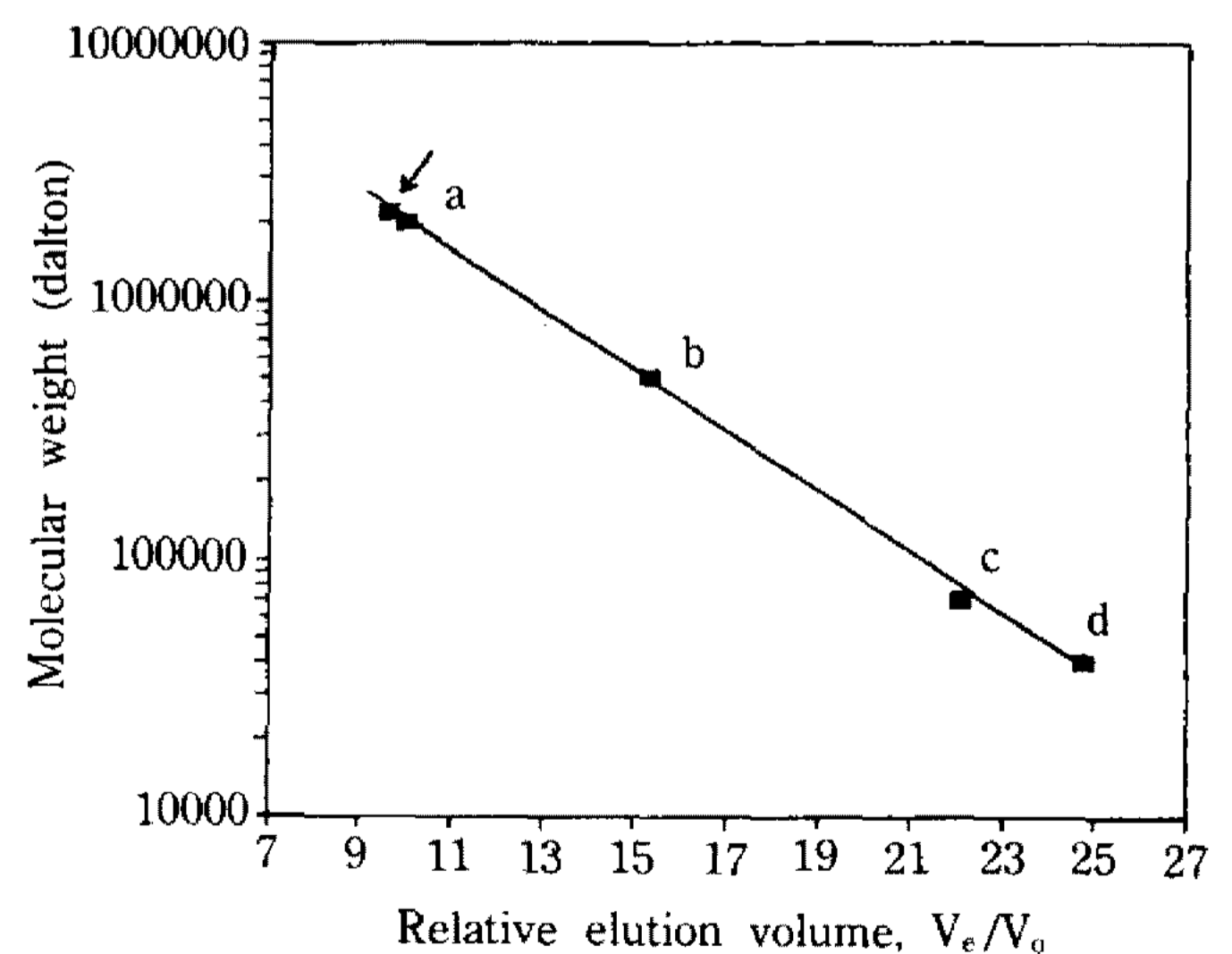
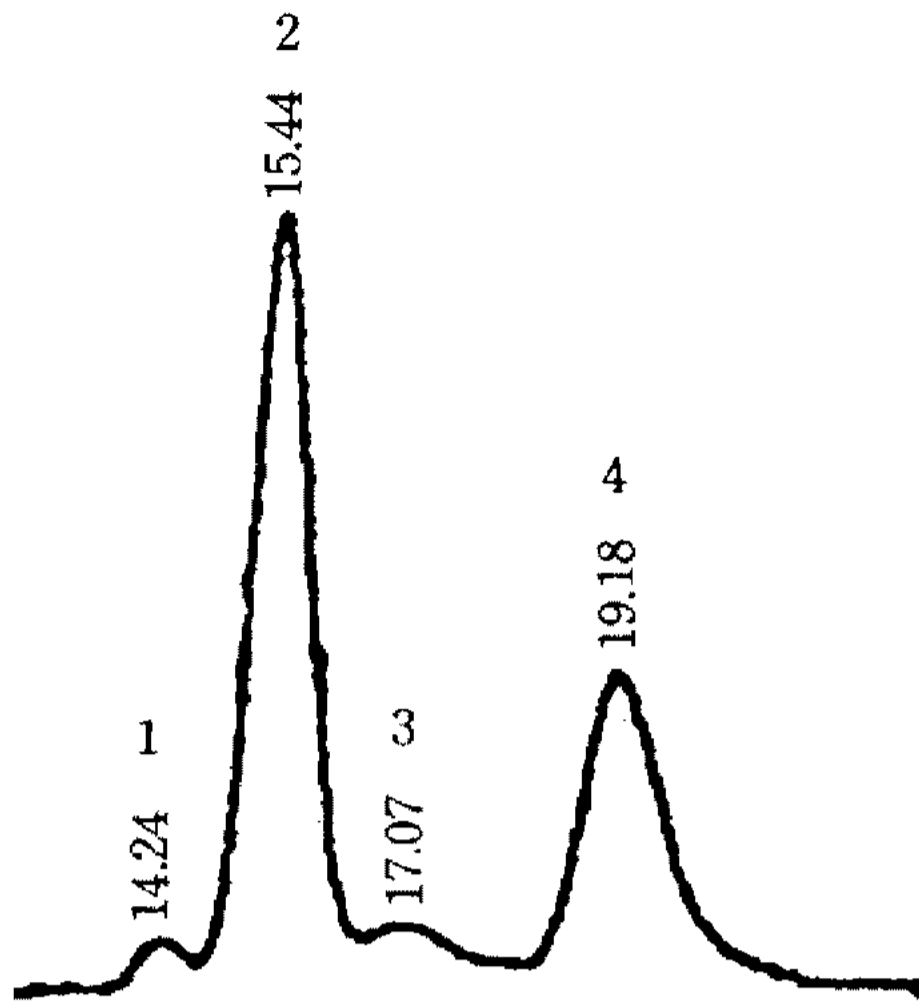
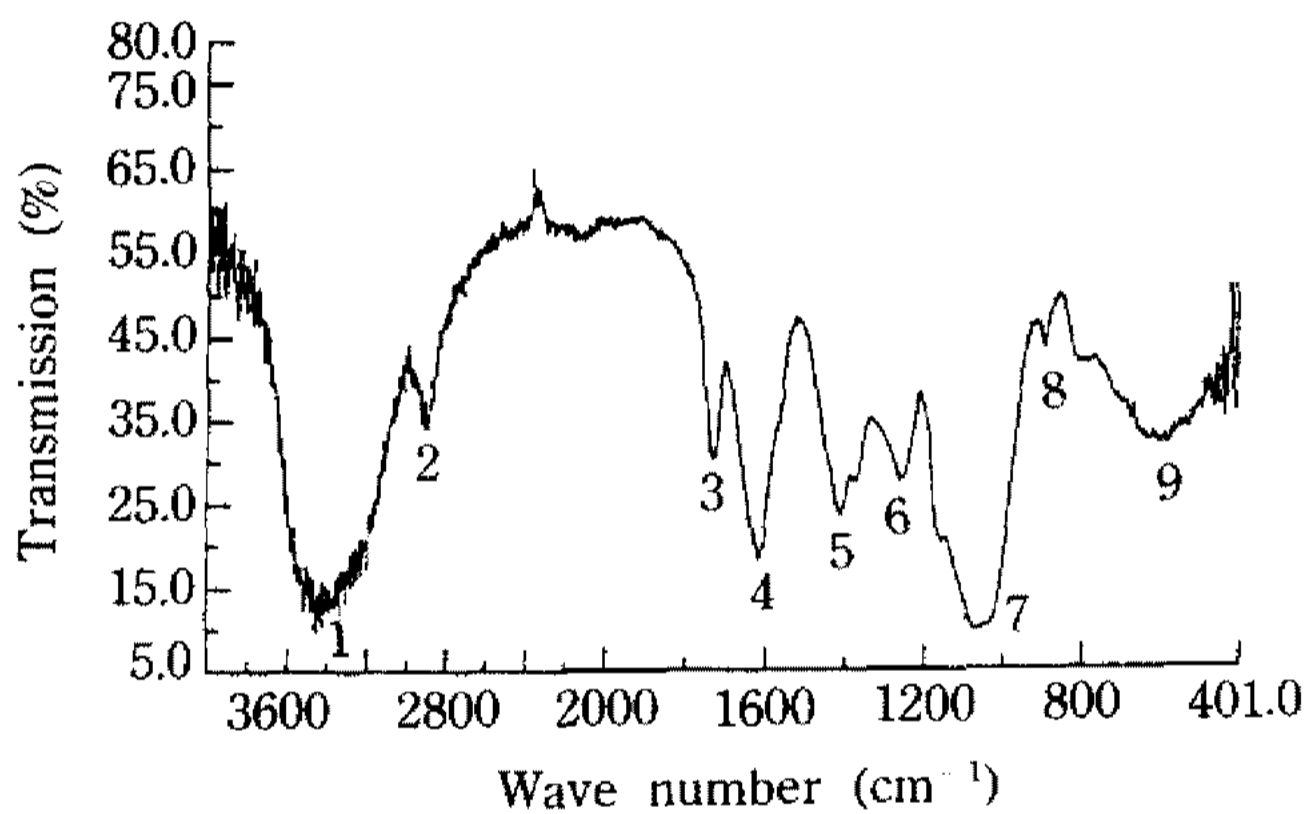


Fig. 1. Estimation of molecular weight of exopolysaccharide EPS-1 by Sepharose 4B gel permeation chromatography.

Standard a: Dextran ( $M_w$ ,  $2 \times 10^6$ ), b: Dextran ( $M_w$ ,  $5 \times 10^5$ ), c: Dextran ( $M_w$ ,  $7 \times 10^4$ ), d: Dextran ( $M_w$ ,  $4 \times 10^4$ )  
Flow rate: 0.3 ml/min., 5.0 ml/tube



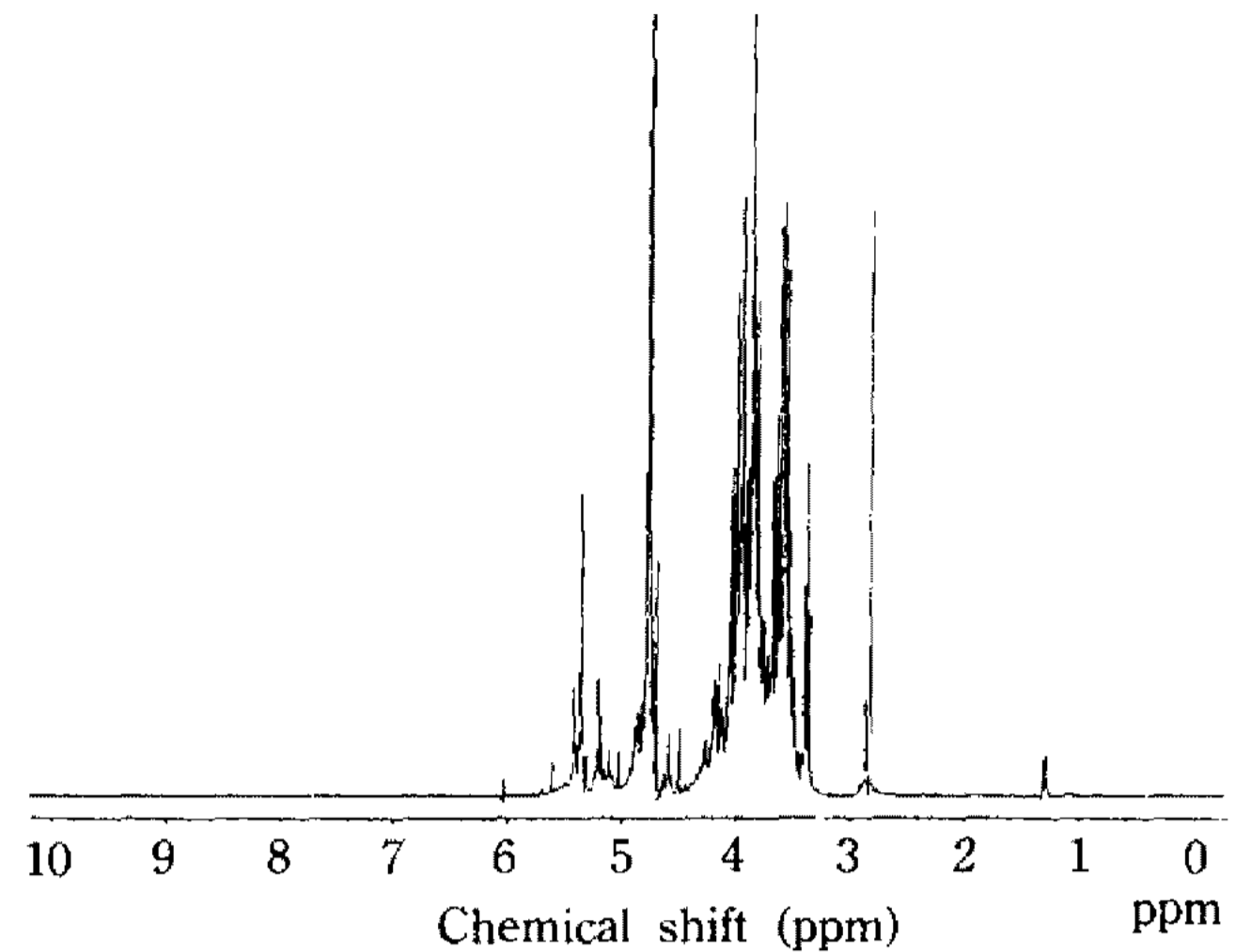
**Fig. 2. High performance liquid chromatogram of the hydrolysate of exopolysaccharide EPS-1.**  
1: Mannose, 2: Glucose, 3: Galactose, 4: Glucosamine



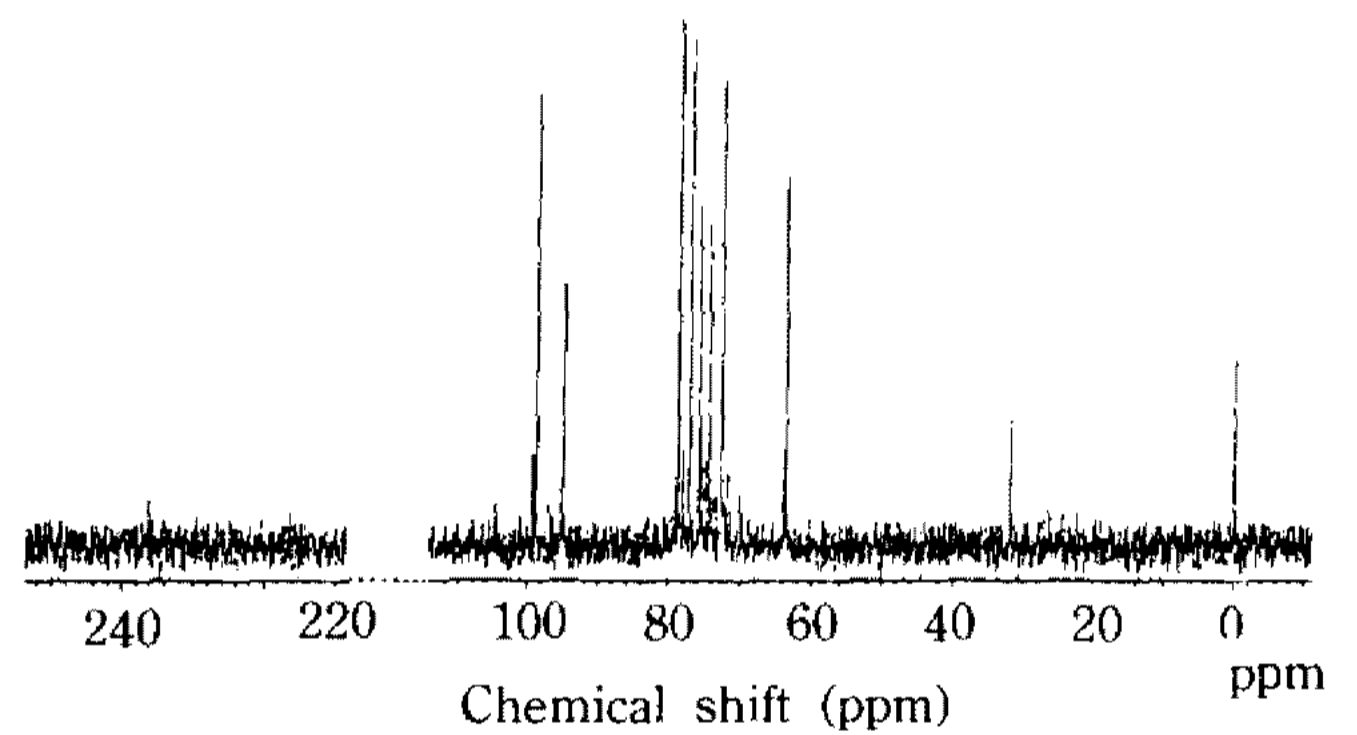
**Fig. 3. Infra red absorption spectrum of the exopolysaccharide EPS-1.**

NMR spectroscopy 산분해 시료를 이용한 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼은 Fig. 4 및 5와 같다. anomeric proton의 chemical shift 값은 4.89, 4.72, 4.69, 4.59 ppm에서 4개가 얻어지는 것으로 보아 gluco stereochemistry와 galacto stereochemistry를 가진 mono-saccharide 들의 glycosidic linkage가 β-form을 형성하고 있는 것으로 확인되었고(Fig. 4), 3.2~4.4 ppm에서의 다중선은 탄수화물에서만 특징적으로 나타나는 현상이며, 2.8 ppm에서 methylene과 1.2 ppm에서 methyl기가 확인되었다.

이러한 결과들은 carbohydrate library와 비교한 결과 β-D-glucosamine, β-D-galactose, β-D-mannose 및 β-D-glucose 임을 확인할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼의 경우 100 ppm 부근(90~112 ppm)의 chemical shift는 anomeric carbon의 특징적인 peak로서 단당류 4종류가 확인되었으며(Fig. 5), 특히 환원형



**Fig. 4. <sup>1</sup>H-N.M.R spectrum of exopolysaccharide EPS-1.**



**Fig. 5. <sup>13</sup>C-N.M.R spectrum of exopolysaccharide EPS-1.**

말단을 가진 단당류로 구성되어 있을 것으로 추정되며 <sup>1</sup>H-NMR의 경우와 일치하고 있다. 이상의 결과로부터 *Xanthomonas* sp. EPS-1 균주가 생산하는 다당류 EPS-1은 최소 4종류 이상의 단당류로 구성되어 있으므로 *Xanthomonas campestris*가 생산하는 xanthan gum의 구성성분과 많은 차이가 있었다.

**농도 의존성**

*Xanthomonas* sp. EPS-1 균주가 생산하는 다당류 용액의 흐름거동을 살펴보기 위하여 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화를 측정하여 double logarithmic plot 하면 의가소형 유체와 같은 거동을 보였다(Fig. 6).

농도가 낮아질수록 의가소성 정도가 높게 나타났으며, 또한 전단속도가 증가될수록 전단응력은 직선적으로 증가되는 경향을 보였다. 다당류 용액의 점성특성을 Power-law equation 및 Herschel-Bulkley equation에 적용시켜 본 결과(Table 1), Herschel-Bulkley equation보다 Power-law equation이 더 높은

상관관계를 나타내었으며 모두가 유동지수 1 이하의 의가소성 유체의 흐름특성을 나타내었다.

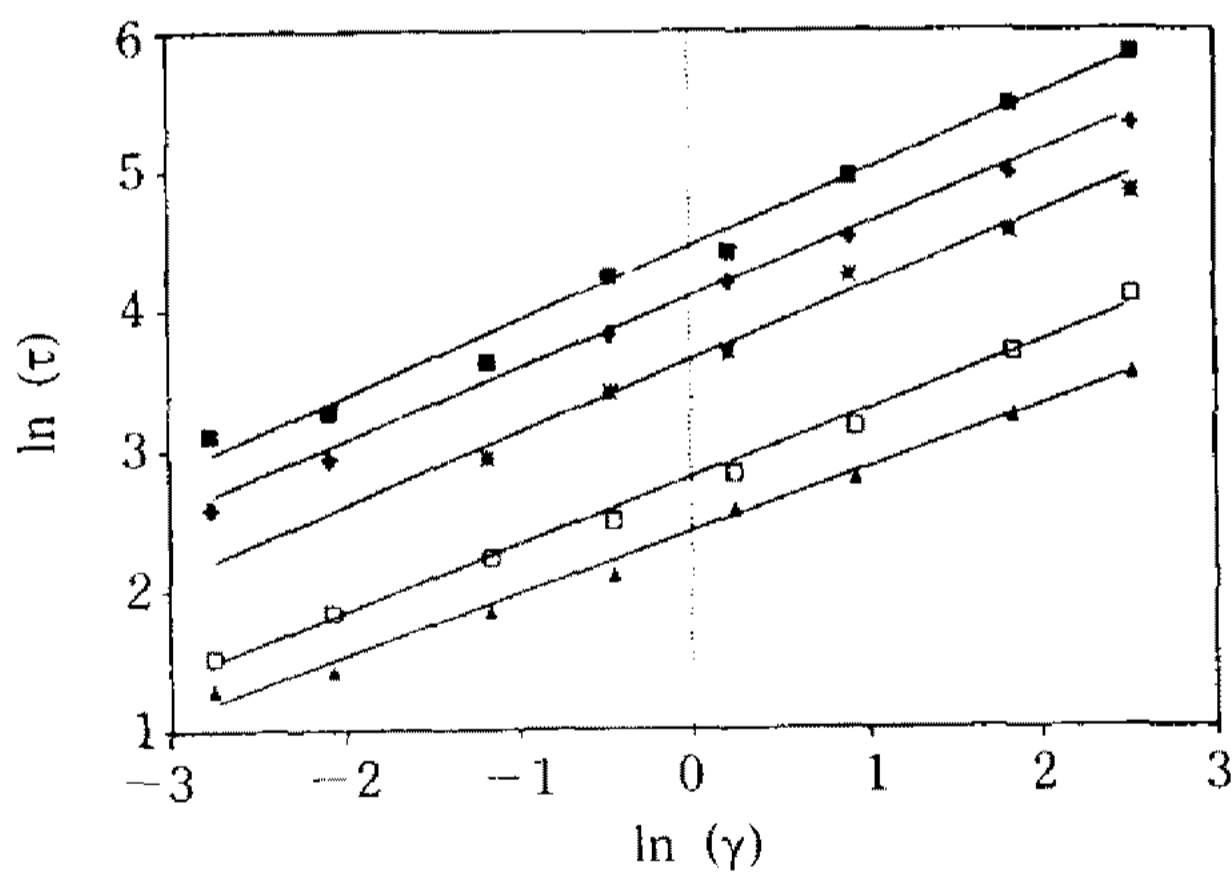
**pH 의존성**

pH 3에서 13까지의 각종 완충용액에 최종 농도가 0.3%(w/v)가 되도록 다당류를 용해시켜 하룻밤 방치시킨 후 겔보기 점도를 측정된 결과(Fig. 7), 전단속도는 1.5 sec<sup>-1</sup>에서 pH 안정성은 pH 5부터 13까지 아주 높게 관찰되었다. *Arthrobacter* sp.가 생산하는 다당류는 pH 4부터 10까지 안정하였으며(16), *Alcaligenes* sp.가 생산하는 다당류는 pH 6부터 10 사이에서 점도가 높다는 보고(17)에 비하여 분리 다당류는 pH 변화에 대하여 훨씬 안정하였다.

**NaCl 첨가효과**

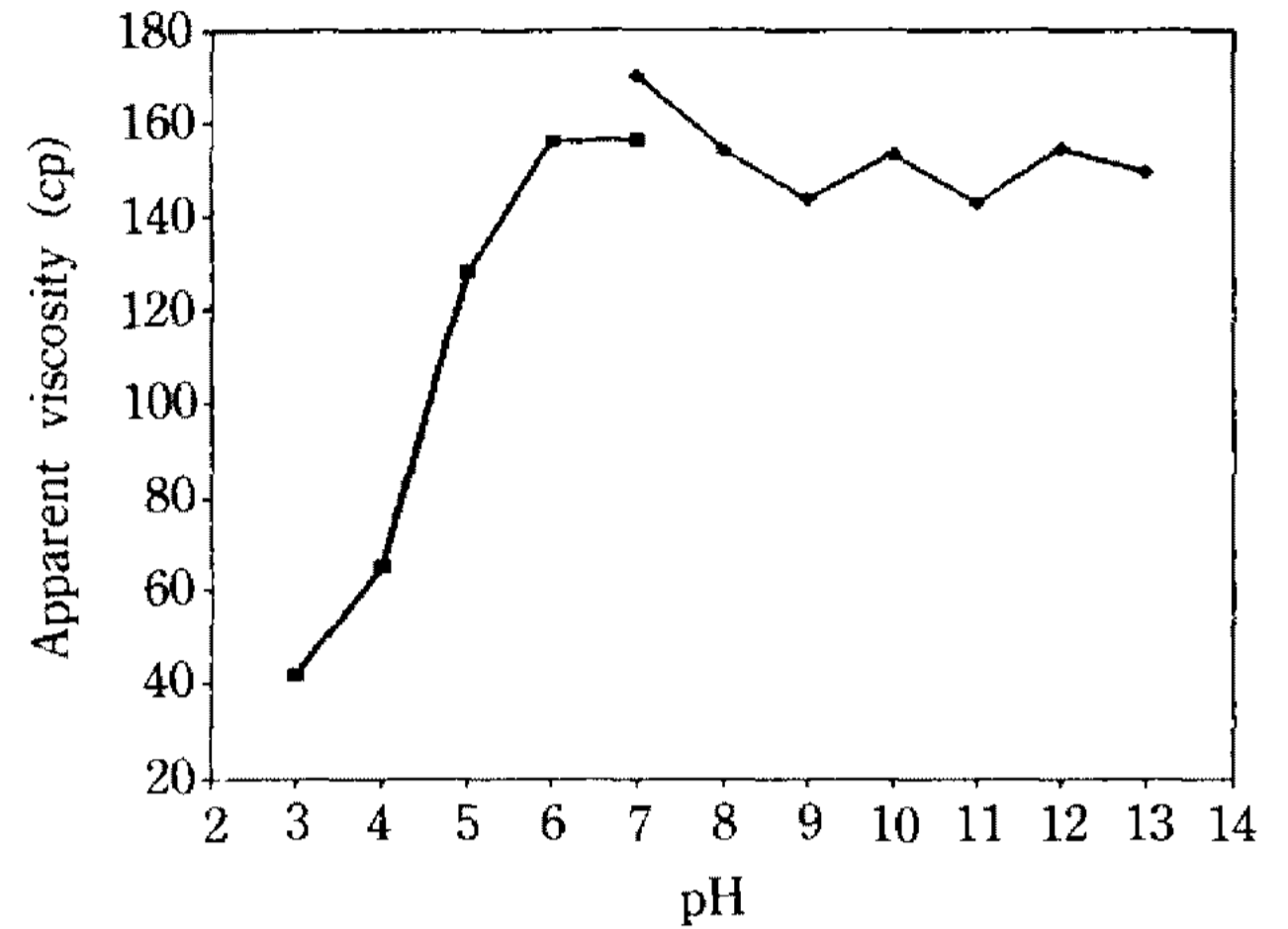
0.3% 다당류 EPS-1 용액에 NaCl을 0.5, 1, 2 및 5% 첨가하여 각 전단속도에서 점도를 측정된 결과 (Fig. 8), 전단속도 1.83 sec<sup>-1</sup>에서 측정된 점도는 각각 146.4, 148, 150.8, 143.6 및 123.2 cp로서 NaCl을 1% 까지 첨가했을 때는 점도가 다소 증가하였으나 5%를 첨가하였을 때는 약 15% 정도 감소되는 경향을 보였다. 그 밖의 전단속도에서도 비슷한 경향을 보였다.

특히, 식품에 일반적으로 이용되고 있는 농도인 3% 이하의 농도에서는 점도가 감소하지 않기 때문에 식품산업의 이용성이 클 것으로 기대된다. *Pseudomonas delafieldii*가 생산하는 다당류는 NaCl을 1.5%까지 첨



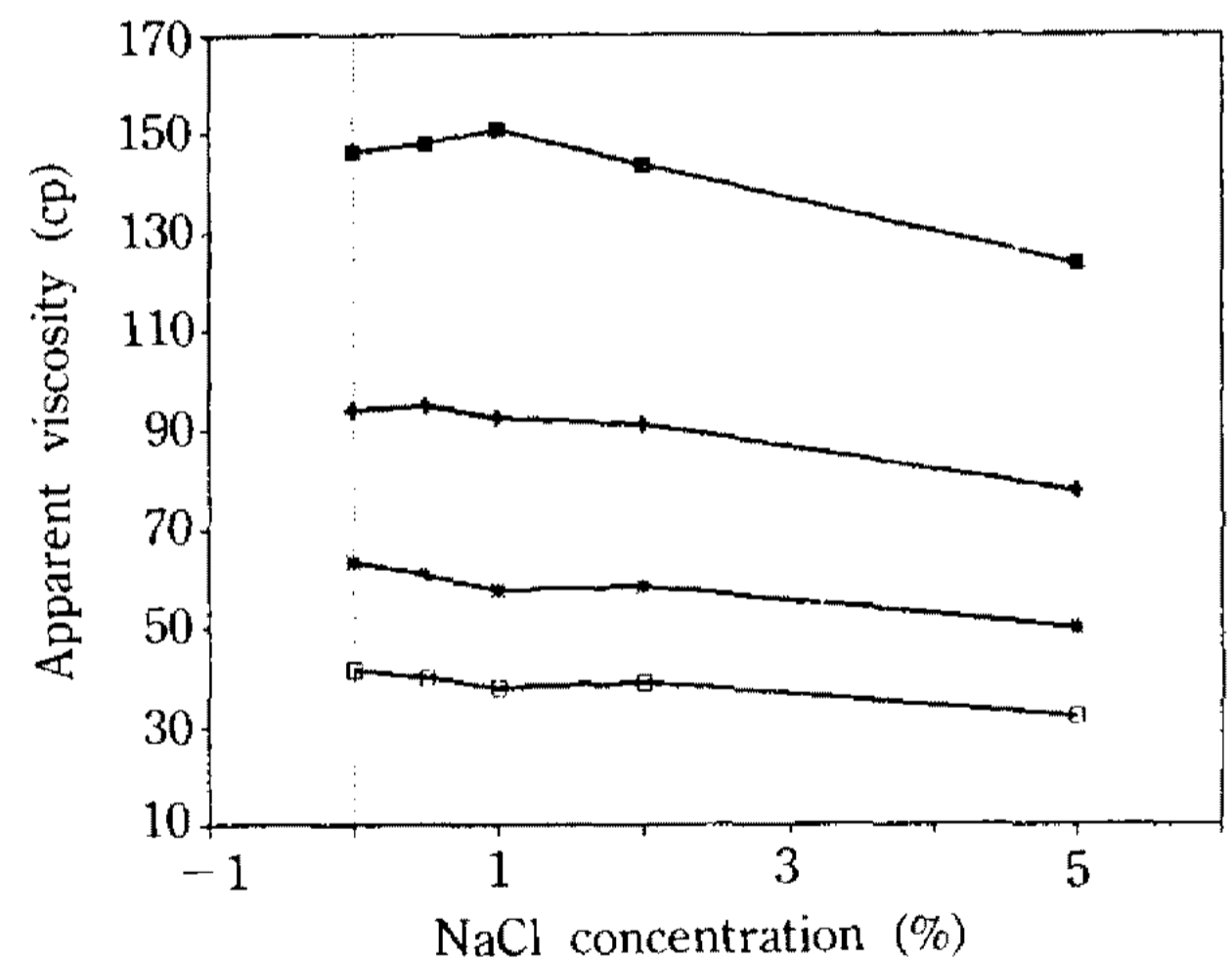
**Fig. 6. Concentraion dependency of exopolysaccharide EPS-1 solution from Power-law equation.**

▲: 1%, □: 2%, \*: 3%, +: 4%, ■: 5%



**Fig. 7. pH dependency of exopolysaccharide EPS-1 solution.**

pH 3~7: Citrate phosphate buffer, pH 7~9: Tris-HCl buffer, pH 10: Glycine-NaOH buffer, pH 11: Phosphate buffer, pH 12~13: Hydroxide-chloride buffer



**Fig. 8. Effect of added NaCl concentration on the viscosity of exopolysaccharide EPS-1 solutions.**

—■— 1.83, —+— 3.67, —\*— 7.34, —□— 14.68 sec<sup>-1</sup>

**Table 1. Rheological parameters of exopolysaccharide EPS-1 solution at various concentration**

ESP-1 conc.(%)	Power-law model			Herschel-Bulkley model			
	n <sub>1</sub> (-)	k <sub>1</sub> (p·sec <sup>-1</sup> )	r <sup>2*</sup>	n <sub>2</sub> (-)	k <sub>2</sub> (p·sec <sup>-1</sup> )	τ <sub>y</sub> (poise)	r <sup>2</sup>
1	0.4419	10.8352	0.9934	0.9348	4.7256	3.4143	0.9250
2	0.4783	16.0322	0.9949	0.8430	8.6374	4.1424	0.9346
3	0.5141	36.8516	0.9857	0.8233	18.1869	14.3133	0.9328
4	0.5091	57.6333	0.9941	0.7805	33.9062	15.4048	0.9162
5	0.5331	83.3543	0.9874	0.8032	51.5679	17.7283	0.9848

\*r: correlation coefficient

**Table 2. Apparent viscosity as a function of temperature for exopolysaccharide EPS-1 at concentration of 0.05 to 0.3% (w/v)**

Shear rate (sec <sup>-1</sup> )	EPS-1 conc. (%)	E <sub>a</sub> (Kcal/mol·°K)	A (×10 <sup>4</sup> pa·s)	r <sup>2</sup>
1.83	0.05	2.5673	1.3013	0.9054
	0.1	4.9414	0.0455	0.9791
	0.3	5.8190	0.0874	0.9789
3.67	0.05	4.0349	0.1149	0.9477
	0.1	4.7066	0.0691	0.9989
	0.3	5.0288	0.2097	0.9984
7.34	0.05	4.5305	0.0388	0.9901
	0.1	4.7547	0.0546	0.9934
	0.3	4.9699	0.1536	0.9939
14.68	0.05	4.0790	0.0602	0.9832
	0.1	4.4433	0.0679	0.9935
	0.3	4.7048	0.1577	0.9959

가하였을 때 점도가 변화되지 않았다는 보고(15)에 비하여 다당류 EPS-1 용액은 NaCl에 대하여 훨씬 안정하였다.

### 온도 의존성

온도를 변화시키면서 일정 전단속도에서 각 농도 별 겔보기 점도를 측정하여 Arrhenius 식에 의한 각 전단속도별로  $\ln(\eta_{app})$ 와  $1/T$ 을 도식하여 frequency factor(A 값)와 유동 활성화에너지(activation energy, E<sub>a</sub>)를 구한 결과(Table 2), 다당류 EPS-1 농도가 0.05%일 때 유동활성화 에너지는 2.5673~4.5305, 0.1%일 때 4.0349~4.9414, 0.3%일 때 4.7048~5.8190 Kcal/mol·°K로 나타나 농도증가에 따른 유동 활성화에너지 값이 크게 변하지 않았는데, 이는 다당류 EPS-1 용액의 내부결합력 즉, 유동에 따른 저항이 농도에 크게 의존하지 않기 때문인 것으로 생각된다.

*Pseudomonas delafieldii*가 생산하는 다당류의 유동 활성화에너지는 다당류 농도가 0.25%일 때 6.29 Kcal/mol·°K이었다고 보고되었는데(15), 다당류 EPS-1은 이에 비하여 유동활성화 에너지가 적어 실제 가공시에 혼합성이 뛰어난 것으로 예상되므로 식품산업에 적용하기가 용이할 것으로 생각된다.

### 요 약

*Xanthomonas* sp. EPS-1 균주의 배양액으로부터 분리한 다당류 EPS-1의 분자량은  $2.1 \times 10^6$  dalton으로

추정되며, 구성성분을 HPLC, IR 및 NMR을 이용하여 분석한 결과 mannose, glucose, galactose 및 glucosamine으로 이루어져 있다. 다당류 EPS-1 용액은 Power-law model을 따르는 비뉴우톤체의 의가소성 특성을 나타내었고, 1.0% 농도에서 점조도 지수(consistency index)와 유동지수(flow behavior index)는 각각 10.8352 poise·sec<sup>n</sup>과 0.4419였다. 또한 이 용액은 pH 5~13까지의 범위에 대하여 안정하였으며, 저농도에서도 높은 점성을 나타내었고, NaCl에 대해서도 매우 안정하였다.

### 기호설명

- A : Frequency factor (Pa·s)  
 E<sub>a</sub> : Activation energy of flow (Kcal/mol·°K)  
 K : Consistency index (poise·sec<sup>n</sup>)  
 n : Non-newtonian index  
 R : Gas constant (1.986 cal/mol·°K)  
 T : Absolute temperature (°K)  
 γ : Shear rate (sec<sup>-1</sup>)  
 η<sub>a</sub> : Apparent viscosity (Pa·s)  
 τ : Shear stress (dyne/cm<sup>2</sup>, poise)  
 τ<sub>y</sub> : Yield stress (poise)

### 참고문헌

1. Yoo, J.Y. and D.H. Jung. 1989. Rheological properties of biopolymer produced by *Pseudomonas delafieldii*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 475-480.
2. Speers, R.A. and M.A. Tung. 1989. Concentration and temperature dependence of flow behavior of xanthan gum dispersions. *Journal of Food Science.* **15**: 96-103.
3. Yoo, J.Y., Y.J. Koo, D.H. Shin and D.H. Chung. 1988. Polysaccharide production by a Gram negative facultatively anaerobic rod. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 98-104.
4. Choi, J.H., U.T. Lee, J.H. Kim and J.S. Rhee. 1989. New extracellular biopolymer produced by *Methylobacterium organophilum* from methanol. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 397-402.
5. 손봉수, 박석규, 강신권, 이상원, 성치남, 성낙재. 1995. 다당류를 생산하는 미생물의 분리와 배양특성. *산업미생물학회지* **23**.
6. Bodie, E.A. and R.D. Schwartz. 1985. Production and characterization of a polymer from *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Micro.* **50**: 629-633.
7. 권기식. 1992. *Bacillus polymyxa* 변이주가 생산하는 exopolysaccharide KS-1의 특성. *전국대학교 박사학위 논문*.

8. Choi, J.H. and U.T. Lee. 1989. New extracellular biopolymer produced by *Methylobacterium organophilum* from methanol. *17*: 397-402.
9. 김병삼, 박노현, 박무현, 한봉호, 배태진. 1990. 마늘 착즙 및 농축액의 rheological properties. *한국식품과학회지* **22**: 646-650.
10. Shin, Y.C., J.K. Han and S.M. Byun. 1990. Effect of aeration rates and rheological properties of fermentation broth on pullulan fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **22**: 533-538.
11. Suh, I.S., H. Herbst, A. Schumpe and W.D. Deckwer. 1990. The molecular weight of xanthan gum polysaccharide produced under oxygen limitation. *Biotech. Lett.* **12**: 201-206.
12. 권순혜, 김명희, 김성곤. 1990. 녹두 전분의 리올로지 성질. *한국식품과학회지* **22**: 38-43.
13. 김미옥, 차희숙, 구성자. 1993. 보리  $\beta$ -glucan의 리올로지 특성. *한국식품과학회지* **25**: 15-21.
14. 김주봉, 이신영, 김성곤. 1992. 옥수수 전분 호화액의 리올로지 특성. *한국식품과학회지* **24**: 54-58.
15. 이부용, 이영철, 김홍만, 김철진, 박무현. 1992. 마 전분 호화액의 리올로지 특성. *한국식품과학회지* **24**: 619-622.
16. Bodie, E.A., R.D. Schwartz and A. Catena. 1985. Production and characterization of a polymer from *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 629-633.
17. Margaritis, A. and G.W. Pace. 1985. *Compressive Biotechnology*. Pergamon Press **3**: 1006-1044.

(Received 10 December 1993)